

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DOCKET NO.: 220738US0PCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Jun ISHIZAKI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/06344

INTERNATIONAL FILING DATE: September 18, 2000

FOR: A GENE ENCODING NOVEL HUMAN SECRETORY TYPE PHOSPHOLIPASE A2

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	11-266616	21 September 1999

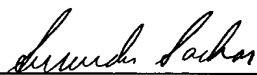
Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/06344. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)


Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/088092 #2

PCT/JP00/06344

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

18.09.00

JP00/6344

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月21日

REC'D 06 NOV 2000	
WIPO	PCT

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第266616号

出願人
Applicant(s):

塩野義製薬株式会社

4

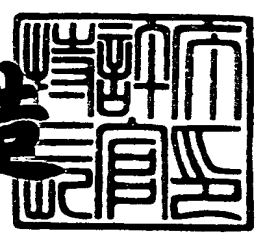
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3085390

【書類名】 特許願
【整理番号】 51-06052
【提出日】 平成11年 9月21日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
【請求項の数】 17

【発明者】

【住所又は居所】 石崎 順

【氏名】 兵庫県川辺郡猪名川町白金 1-97-4

【発明者】

【住所又は居所】 鈴木 紀子

【氏名】 大阪府大阪市福島区鷺洲 6-1-1-815

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院新田壱ノ段町 1

【氏名】 花崎 浩二

【特許出願人】

【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【識別番号】 000001926

【代理人】

【識別番号】 100108970

【弁理士】

【氏名又は名称】 山内 秀晃

【電話番号】 06-6455-2056

【選任した代理人】

【識別番号】 100113789

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉田 健一

【電話番号】 06-6455-2056

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044602

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9720909

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ヒト分泌型ホスホリパーゼ A₂ をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 30 の 1 位の Asn から 1 2 3 位の Cys までのアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 2】 配列番号 30 の - 1 9 位の Met から 1 2 3 位の Cys までのアミノ酸配列を含む請求項 1 記載のタンパク質。

【請求項 3】 請求項 1 または 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含み、かつホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】 配列番号 29 の 1 1 6 位の A から 4 8 4 位の C までの塩基配列を含む請求項 4 記載の DNA。

【請求項 6】 配列番号 29 の 5 9 位の A から 4 8 4 位の C までの塩基配列を含む請求項 5 記載の DNA。

【請求項 7】 請求項 5 または 6 に記載の DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、ホスホリパーゼ A₂ 活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 8】 請求項 4 から 7 のいずれかに記載の DNA を有する発現ベクター。

【請求項 9】 請求項 8 記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。

【請求項 10】 宿主が哺乳類細胞株である請求項 9 記載の形質転換体。

【請求項 11】 請求項 9 または 10 に記載の形質転換体を培養する工程、および生産された請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質を培養培地から回収する工程を包含する、該タンパク質の製造方法。

【請求項 12】 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質を特異的に認識する抗体。

【請求項 13】 請求項 12 に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A_2 関連疾患の診断薬。

【請求項 14】 請求項 12 に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A_2 の測定キット。

【請求項 15】 請求項 12 に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A_2 関連疾患の治療薬。

【請求項 16】 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質を用いた、ホスホリパーゼ A_2 活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法。

【請求項 17】 請求項 16 に記載のスクリーニング方法より得られる化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヒト分泌型ホスホリパーゼ A_2 ；本発明タンパク質をコードするDNA；本発明DNAを含む発現ベクター；本発明発現ベクターを有する形質転換体；本発明形質転換体を用いたヒト分泌型ホスホリパーゼ A_2 の製造方法；本発明タンパク質を特異的に認識する抗体；本発明タンパク質を用いた化合物のスクリーニング方法；本発明のスクリーニング方法により得られた化合物に関する。

【0002】

【従来の技術】

ホスホリパーゼ A_2 (PLA $_2$ ； EC 3.1.1.4) は、3-sn-ホスホグリセリドの2-アシルエステル結合を加水分解するリン脂質分解酵素の総称である。PLA $_2$ は、食物中のリン脂質消化や生体膜リン脂質の新生と代謝などに関わるとともに、プロスタグランジンなどの脂質メディエーター産生にいたるアラキドン酸カスケードの開始酵素として機能する。哺乳動物では多様なPLA $_2$ の存在が明らかになっており、その局在性、カルシウムイオン (Ca $^{2+}$) 要求性、基質特異性に基づいて、分泌型PLA $_2$ 、細胞質型PLA $_2$ 、Ca $^{2+}$ 非依存型PLA $_2$ 、ならびにPlatelet-Activating Factor-アセチルヒドロラーゼの4つのファミリーに分類されている (Balsindeら、J. Biol. Chem. 272, 16069-16072 (1997))。

【0003】

このうち分泌型PLA₂ファミリーは、細胞外に分泌される低分子量（13,000 ～ 15,000）のPLA₂分子群であり、IB型、IIA型、IID型、IIC型、V型、ならびにX型の6種類が知られている。いずれの分子種も、その構造中に12～16個のCys残基を持ち、分子内ジスルフィド結合を形成しており、またHis-Asp残基からなる活性中心部位が保存されている。さらに、共通のCa²⁺結合領域を持ち、酵素活性の発現にはmMオーダーのCa²⁺を要求する（Tischfieldら、J. Biol. Chem. 272, 17247-17250 (1997)、Cupillardら、J. Biol. Chem. 272, 15745-15752 (1997)、およびIshizakiら、J. Biol. Chem. 274, 24973-24979 (1999)）。

【0004】

IB型は、脾臓等で消化酵素として機能するほか、その特異的なレセプターへの結合を介してエンドトキシンショックなどの炎症病態の形成に関与していると考えられている。一方、IIA型は、血小板や滑膜細胞などに存在し、炎症性サイトカインの刺激で発現が増強されることから、種々の炎症反応に関与していると考えられている。しかしながら、IIA型を遺伝的に欠損しているマウス種でも炎症反応は通常どおり起こることから、その病態生理学上の意義に疑問が提示されている。V型は、心臓とともに炎症系細胞に発現している。またX型は、脾臓、胸腺など免疫系の組織に発現している。両者とも生体防御や炎症反応への関与が示唆されているが、その生体内での重要性については十分明らかにされていない（花崎ら、細胞工学、17, 694-701 (1998)）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、新規ヒト分泌型ホスホリパーゼA₂；本発明タンパク質をコードするDNA；本発明DNAを含む発現ベクター；本発明発現ベクターを有する形質転換体；本発明形質転換体を用いたヒト分泌型ホスホリパーゼA₂の製造方法；本発明タンパク質を特異的に認識する抗体；本発明タンパク質を用いた化合物のスクリーニング方法；本発明のスクリーニング方法により得られた化合物を提供することにある。

【 0 0 0 6 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、マウスX型PLA₂の生理機能の解明を目指して鋭意研鑽を重ねてきたが、その過程で、Expressed Sequence Tags (EST) データベースの遺伝子配列中に、マウスX型PLA₂と相同性のある部分配列を見出し、その配列を基に、マウス脾臓cDNAライブラリーより新規分泌型PLA₂タンパク質をコードするDNA配列を見出した。さらにこの塩基配列を基にしてヒト小腸cDNAライブラリーよりヒト分泌型PLA₂タンパク質をコードするDNA配列を見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明は、

配列番号 3 0 の 1 位のAsnから 1 2 3 位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質。

配列番号 3 0 の - 1 9 位のMetから 1 2 3 位のCysまでのアミノ酸配列を含む本発明のタンパク質；

本発明のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含み、かつホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質；

本発明のタンパク質をコードするDNA；

配列番号 2 9 の 1 1 6 位のAから 4 8 4 位のCまでの塩基配列を含む本発明のDNA；

配列番号 2 9 の 5 9 位のAから 4 8 4 位のCまでの塩基配列を含む本発明のDNA；

本発明のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、ホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質をコードするDNA；

本発明のDNAを有する発現ベクター；

本発明の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体；

宿主が哺乳類細胞株である本発明の形質転換体；

本発明の形質転換体を培養する工程、および生産された本発明のタンパク質を培養培地から回収する工程を包含する、該タンパク質の製造方法；

本発明のタンパク質を特異的に認識する抗体；

本発明の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A_2 関連疾患の診断薬；

本発明の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A_2 の測定キット；

本発明の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A_2 関連疾患の治療薬；

本発明のタンパク質を用いた、ホスホリパーゼ A_2 活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法；

本発明のスクリーニング方法より得られる化合物、に関する。

【0008】

本発明のタンパク質は、「配列番号30の1位Asnから123位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」であり、好ましくは「配列番号30の-19位のMetから123位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」である。「配列番号30の1位Asnから123位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」は、分泌型PLA $_2$ の成熟タンパク質であり、「配列番号30の-19位のMetから123位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」は、シグナルペプチドを含む未成熟なタンパク質である。または本発明のタンパク質には「該アミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含み、かつホスホリパーゼ A_2 活性を有するタンパク質」を含む。「アミノ酸の置換、欠失、挿入又は付加」の程度及びそれらの位置等は、改変されたタンパク質が、配列番号30で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同様にホスホリパーゼ A_2 活性を有するタンパク質であれば特に制限されない。本発明において「ホスホリパーゼ A_2 活性」とは、「3-sn-ホスホグリセリドの2-アシルエステル結合をCa $^{2+}$ 依存的に加水分解するリン脂質分解活性」を意味する。

なお、これらアミノ酸配列の変異等は、天然において、例えば突然変異や翻訳後の修飾等により生じる場合もあるが、本発明DNAに基づいて人為的に改変することもできる。本発明のタンパク質は、このような改変・変異の原因・手段等を問わず、上記特性を有する全ての改変DNAによりコードされるタンパク質を含む

【0009】

本発明のDNAとは、「本発明のタンパク質をコードするDNA」を指す。本発明のDNAとして、好ましくは、本発明の成熟タンパク質をコードする配列番号29の116位のAから484位のCまでの塩基配列を含むDNAが例示される。更に好ましくは、本発明の未成熟なタンパク質をコードする配列番号29の59位のAから484位のCまでの塩基配列を含むDNAが例示される。本発明のDNAとストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質をコードするDNAも、本発明のDNAに含まれる。「DNAにストリンジントな条件でハイブリダイズするDNA」は、コード領域のDNAをプローブとして用いることにより得ることが出来る。ここで、「ストリンジントな条件でハイブリダイズする」とは、例えば、6 x SSC、0.5%SDSおよび50%ホルムアミドの溶液中で42℃にて加温した後、0.1xSSC、0.5%SDSの溶液中で68℃にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリダイズのシグナルが観察されることを表す。

【0010】

本発明のDNAを用いて、組換えタンパク質を生産するには、例えば、Molecular Cloning等の多くの教科書や文献に基づいて実施することができる。具体的には、発現させたいDNAの上流に翻訳開始コドンが付加し、下流には翻訳終止コドンが付加する。さらに、転写を制御するプロモーター配列（例えば、trp、lac、T7、SV40初期プロモーター）等の制御遺伝子を付加し、適当なベクター（例えば、pBR322、pUC19、pSV・SPORT1など）に組み込むことに、宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製する。

【0011】

次に、発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、哺乳類などの多細胞生物の細胞などが挙げられる。好ましくは、哺乳類の細胞であり、哺乳類の細胞としては、CHO細胞、293細胞、COS-7細胞などが例示できる。

【0012】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドまたはエピトープを構成しうるペプチ

ド断片に対する抗体であり、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体のいずれをも含む。分泌型PLA₂は、脂肪酸（例えば、アラキドン酸）の放出に関与している。過剰な脂肪酸の放出は、敗血症ショック、成人呼吸困難症候群、肺炎、外傷、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ等の疾病の原因となる。従って、分泌型PLA₂の濃度を測定することで、これら疾患の診断が可能となる。本発明の抗体は、分泌型ホスホリパーゼA₂関連疾患の診断薬及び測定キットを提供する。また、本発明の抗体がPLA₂の活性を阻害する場合、抗体自身がPLA₂に起因する疾患の治療薬となる。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明は、おもに新規ヒト分泌型ホスホリパーゼA₂に関する。
以下に本発明タンパク質の調製工程、抗体の調製工程、本発明タンパク質を用いた、ホスホリパーゼA₂活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法を説明する。本明細書において、特に指示のない限り、当該分野で公知である遺伝子組換え技術、動物細胞、昆虫細胞、酵母および大腸菌での組換えタンパク質の生産技術、発現したタンパク質の分離精製法、分析法および免疫学的手法が採用される。

【0014】

本発明分泌型PLA₂をコードするDNA配列

本発明のDNAは本発明により教示された配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる(Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989)等参照)。具体的には本発明DNAが発現される適当な起源より、常法に従ってcDNAライブラリーを調製し、該ライブラリーから本発明DNAに特有の適当なプローブや抗体を用いて所望のクローンを選択することにより実施できる(Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 22, 778 (1983)等参照)。cDNAの起源としては、本発明のDNAを発現する各種の細胞、組織やこれらに由来する培養細胞等が例示される。これらからの全RNAの分離、mRNAの分離・精製、cDNAの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。また、cDNAライブラリーは市販されており、本発明において

はそれらcDNAライブラリー、例えばClontech社より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

【0015】

本発明のDNAをcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に限定されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAによって産生されるタンパク質に対して、該タンパク質特異的抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組み合わせ等を例示できる。ここで用いられるプローブとしては、本発明DNAの塩基配列に関する情報をもとに化学合成されたDNA等が一般的に例示できるが、勿論既に取得された本発明DNAそのものや断片も良好に利用できる。また、本発明DNAの塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

【0016】

本発明DNAの取得に際しては、PCR法(Science, 230, 1350 (1985))によるDNA/RNA増幅法も好適に利用できる。ライブラリーから全長cDNAが得られにくい場合には、RACE法(Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6), 35 (1988))等の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明により明らかにされた本発明DNAの配列情報に基づいて適宜設定できる。このようなプライマーは、常法に従い合成できる。なお、増幅させたDNA/RNA断片の単離・精製は、前記のとおり常法に従い行なうことができる。例えば、ゲル電気泳動法等により行なうことができる。また、上記で得られる本発明DNAあるいは各種断片は、常法、例えばジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977))やマキサム・ギルバート法(Methods in Enzymology, 65, 499 (1980))等に従って、また簡便には市販のシークエンスキット等を用いて、その塩基配列を決定することができる。

以下、本発明におけるDNAのクローニング方法につき説明する。

【0017】

(1) マウス分泌型PLA₂をコードするDNAの配列決定

まず始めに、本発明のヒト分泌型PLA₂に対応するマウス分泌型PLA₂をコードするDNA断片の配列決定方法を以下に例示する。マウスX型PLA₂と相同性を示す配列をESTデータベースから見出し、その配列に対してプライマーを作製し、マウス脾臓由来のcDNAライブラリー等を鋳型としてPCR (Polymerase Chain Reaction) を行う。得られたDNA断片をDNAシーケンシングにより分析することにより、マウス分泌型PLA₂をコードするDNA断片が決定され得る。

【0018】

(A) 新規PLA₂ cDNA断片の単離とマウス組織での発現パターンの解析

DNA断片が由来する遺伝子と、その遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析するためには、この断片から5'側および3'側につながる未同定のcDNAを単離し、同時にこの断片自身の配列を再確認する必要がある。そのためには、まず、その遺伝子の発現量の多い組織を材料に用いることが実験操作上有利である。

【0019】

組織における発現の有無ならびに組織間での相対発現量は、各組織から抽出したmRNAを固定したシートを放射標識したDNA断片(プローブ)とハイブリダイゼーションすることによって確認することができる(ノザン解析)。マウス各組織における発現量をノザン解析によって比較するためには、プローブとして用いるPLA₂ cDNA断片を得る必要がある。このような断片は、例えば、ESTデータベースの塩基配列を基に作製したプライマーから、マウス組織由来のcDNA試料を鋳型とするPCRによって単離することが可能である。得られたcDNA断片(配列番号1)

をプローブとしたノザン解析を行なった。その結果、該遺伝子は、マウス心臓に多く発現していることが判明した。

【0020】

(B) マウス分泌型PLA₂をコードする全長cDNAの単離

cDNAの既知部分(中央部)の情報から、cDNAの5'端3'端を含む上流下流部分の配列は、例えば、あらかじめ5'端3'端にある特定の配列からなるアダプターDNAが付加されているcDNA試料を鋳型にして、この特定の配列に対応するオ

リゴマーとPLA₂ cDNA断片に特異的なオリゴマーのペアでPCRを行うことによって得ることができる (Rapid Amplification of cDNA End: RACE法)。cDNA試料としては、マウス脾臓由来のMarathon-ready cDNA (Clontech社) を用いた。配列表の配列番号14と配列番号15に、このようにして得られたマウス分泌型PLA₂タンパク質遺伝子を有するDNAの配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。

【0021】

(C) ヒト分泌型PLA₂をコードする全長cDNAの単離

一般的に、マウスとヒトでは同じタイプの遺伝子の配列は互いに高い相同性を持つと期待できる。また、これまでにその構造が知られている様々な動物種由来のPLA₂で必ず保存されているアミノ酸残基 (コンセンサス配列) は、新規PLA₂においても保持されていると予想される。従って、コンセンサス配列に対応するcDNA配列はヒト型PLA₂のcDNA配列とも特に相同性が高く、マウスPLA₂遺伝子の配列情報をもとにヒトの相同遺伝子をクローニングする場合に利用価値がもっとも高い領域と考えられる。さらに、本発明のマウスのcDNA配列は、IIA型、IID型との相同性が高いことが判明したので、本発明のヒト分泌型PLA₂遺伝子もIIA型、IID型との相同性が高いと予測できる。以上の仮定のもとに、これらのPLA₂に保存されているコンセンサス配列を基にしてオリゴマーを設計し、ヒトGenomic DNA (BOEHRINGER MANNHEIM) を鋳型としたPCRを行って、対応するヒト分泌型PLA₂の部分配列をクローニングした。このヒトPLA₂ cDNA中央部の情報から、cDNAの5' 端3' 端を含む上流下流部分の配列は、例えば、あらかじめ5' 端3' 端にある特定の配列からなるアダプターDNAが付加されているcDNA試料を鋳型にして、この特定の配列に対応するオリゴマーとPLA₂ cDNA断片に特異的なオリゴマーのペアでPCRを行うことによって得ることができる (上記 RACE法)。あるいは、相同性が高いと予想できるマウスPLA₂ cDNAの塩基配列情報よりヒトcDNAライブラリーを鋳型としたPCRを行うことによって得ることができる。cDNA試料としては、発現量の多いと予想されるヒト小腸由来のMarathon-ready cDNAを用いた。配列表の配列番号29と配列番号30に、このようにして得られたヒト分泌型PLA₂タンパク質遺伝子を有するDNAの配列とそれによってコードされるアミノ酸配列

を示す。

【0022】

本発明タンパク質の調製

(1) 組換え型PLA₂タンパク質の発現

本発明のタンパク質は、本発明のDNA配列情報に従って、遺伝子工学的手法(Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983)等)により、組換えタンパク質として得ることができる。より詳細には、所望のタンパク質をコードする遺伝子を適当なベクターに組み込む。このベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を作成する。該形質転換体を培養することにより組換えタンパク質を得ることができる。

ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のいずれも用いることができる。該真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞(Cell, 23, 175 (1981))やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞等がよく利用される。

発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していても良い。該発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr (Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981))等を例示できる。また、真核微生物としては、酵母が一般によく用いられ、中でもサッカロミセス属酵母を利用できる。該酵母の発現ベクターとしては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有するpAM82(Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983))等を利用できる。

【0023】

原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌が一般によく利用される。これらを宿主とする場合、例えば該宿主菌中で複製が可能なプラスミドベクターを用い、このベクター中に所望の遺伝子が発現できるように該遺伝子上流にプロモーター及びSD配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドンが付与した発現プラスミド

を利用するのが好ましい。上記宿主としては、E. coli K12株等が利用される。ベクターとしては一般にpBR322及びその改良ベクターがよく利用されるが、これらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターも利用できる。プロモーターとしては、例えばtrpプロモーター、lppプロモーター、lacプロモーター、PL/PRプロモーター等を使用できる。

【0024】

所望の組換えDNAの宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により所望のタンパク質が産生される。該培養に用いられる培地としては、宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞に適した条件下で実施できる。例えば、pSVL SV40後期プロモーターの下流に本発明のヒト分泌型PLA₂遺伝子を含むベクターを、サル由来細胞COS-7に導入することによって形質転換体を作成し、この形質転換体を5% CO₂存在下、37℃で3日間培養することにより、組換え分泌型PLA₂タンパク質が産生され得る。

【0025】

組換えタンパク質は、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作(Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987)等)により分離・精製できる。該方法としては、塩析法、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、ゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組み合わせ等を例示できる。

【0026】

(2) 変異体の作製

アミノ酸配列は、任意のアミノ酸配列を欠失させ、所望のアミノ酸、ないしはアミノ酸配列を導入することによって置換される。アミノ酸配列の置換処理には、プロテインエンジニアリングとして知られる方法が広く利用できるが、例えば、Site-directed deletion (部位指定削除) 法 (Nucl. Acids Res., 11, 1645,

1983)、Site-specific mutagenesis (部位特異的変異) 法 (Zoller, M. J. et al., Methods in Enzymol., 100, 468, 1983, Kunkel, T.A. et al., Methods in Enzymol., 154, 367-382, 1987)、PCR突然変異生成法、制限酵素処理と合成遺伝子の利用による方法等がある。

部位特異的変異法であれば、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版第1-3巻 Sambrook, J.ら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版New York 1989年に記載の部位特異的変異誘発法やPCR法などの方法を用い、本発明のDNA配列に変異を導入する。

これら方法により変異が導入されたDNA配列は、適当なベクターおよび宿主系を用いて、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻 Sambrook, J.ら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版New York 1989年に記載の方法により、遺伝子工学的に発現させればよい。例えば、MutanTM-SuperExpress Km、MutanTM-K (宝酒造社製)、Quik Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社製) といったキットが使用できる。

【0027】

一般に、部位特異的変異法は、まず、タンパク質をコードするDNA配列をその配列中に含む一本鎖ベクターを得ることによって実施することができる。所望の突然変異した配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーを、一般的には合成によって、例えばクレア等 (Crea, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 5765, 1978) の方法によって製造する。次に、このプライマーを一本鎖の本DNA配列含有ベクターとアニーリングし、大腸菌ポリメラーゼIクレノウフラグメントのようなDNA重合酵素を作用させて、突然変異含有鎖の合成を完成する。このようにして、第一の鎖は元の非突然変異配列をコードしており、第二の鎖は所望の突然変異を有しているヘテロ二本鎖が形成される。次いで、この二本鎖ベクターを用いて、適当な細菌、または細胞を形質転換し、³²P-標識突然変異生成プライマーから成る放射性プローブへのハイブリダイゼーションを介してクローンを選択する (Wallace, R.B., Nucleic Acids Res., 9, 3647, 1981)。選択されたクローンには、突然変異した配列を有する組換えベクターを含んでいる。このようなクローンを選択した後、突然変異した本タンパク質の領域を形質転換に使

用される型の発現ベクターに入れることができる。

以降、(1)で示した組換えタンパク質の調整方法に従い、変異体を宿主細胞に産生させることができる。

【0028】

PLA₂活性の測定

上記で得られた組換え体および変異体がPLA₂活性を有するか否かは、以下の判定方法に従う。

①組換え分泌型PLA₂タンパク質産生培養物と組換え分泌型PLA₂タンパク質を含まないコントロール培養物を、³H-オレイン酸で標識した大腸菌膜リン脂質画分と反応させる。

②遊離された³H-オレイン酸の量を、Elsbachらの方法(Methods Enzymol., 197, 24-31 (1991))に従い測定する。

③³H-オレイン酸の量を比較することにより、PLA₂活性の有無を判定する。

【0029】

本発明タンパク質に対する抗体の調製

本発明のタンパク質に対する抗体は、以下の方法により作製される。

(1) ポリクローナル抗体の作製

推定されるアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチドや、本タンパク質を発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、などにより産生されたタンパク質を通常のタンパク化学的方法で精製し、これらを免疫原とする。この免疫原を用いて、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H.D.ら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版 New York 1989年などに記載の方法に従って、適切な方法で動物を免疫することにより、抗原となるタンパク質を特異的に認識するポリクローナル抗体を容易に作製し、精製することができる。マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物を免疫し、その血清由来のポリクローナル抗体を作製すればよい。

【0030】

(2) モノクローナル抗体

前述の免疫原で免疫したマウスやラットの脾臓またはリンパ節からリンパ球を

取りだし、ミエローマ細胞と融合させてKohlerとMilsteinの方法(Nature, 256, 495-497(1975))

に従ってハイブリドーマを作製した後、該ハイブリドーマから単クローン抗体を産生させ得る。例えば以下の工程により本タンパク質のモノクローナル抗体を得ることができる：

- (a) タンパク質によるマウスの免疫、
- (b) 免疫マウスの脾臓の除去および脾臓細胞の分離、
- (c) 分離された脾臓細胞とマウスミエローマ細胞との融合促進剤（例えばポリエチレングリコール）の存在下での上記のKohlerらに記載の方法による融合、
- (d) 未融合ミエローマ細胞が成長しない選択培地での得られたハイブリドーマ細胞の培養、
- (e) 酵素結合免疫吸着検定 (ELISA)、ウェスタンブロットなどの方法による所望の抗体を生産するハイブリドーマ細胞の選択および限定希釈法等によるクローニング、
- (f) モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞を培養し、モノクローナル抗体を収穫する。

【0031】

分泌型PLA₂の測定キット及び分泌型PLA₂関連疾患の診断薬

本発明においては、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて、本発明タンパク質の測定を行なうことができる。本発明タンパク質に対する抗体を用いる測定法は被測定液中の抗原量（例えば、本発明タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作成した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法を用いることができる。

抗原または抗体の固相化に当たっては、また通常、タンパク質あるいは酵素等の固相化するのに用いられる化学的結合を用いることができる。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポ

リアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては、下記の工程により被測定液中の本発明タンパク質量を測定することができる。

(1) 固相化した本発明のモノクローナル抗体と被測定液を反応させ、標識化した別の本発明モノクローナル抗体を反応させる。

(2) 固相化担体上の標識剤の活性を測定する。

固相化抗体と標識化抗体は同一の抗体である必要はない。例えば、固相化抗体が本タンパク質のN末端を認識する抗体であれば、標識化抗体はC末端を認識する抗体を用いることができる。

標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質が用いられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C などが用いられる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが用いられる。

これら測定法によって、本タンパク質の濃度が過剰であった場合には、敗血症ショック、成人呼吸困難症候群、肺炎、外傷、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ等の疾病であると診断することができる。

従って、本発明の抗体は、このような診断を可能にする「診断薬」および「測定キット」を提供する。

【0032】

PLA₂活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明において「スクリーニング方法」としては、例えば本発明のタンパク質を用いたハイ・スループット・スクリーニングが挙げられる。たとえば、Reynoldsらの方法 (Anal. Biochem. 204, 190-197 (1992)) に従って、96穴プレート内に、試料とリン脂質基質 (racemic diheptanoyl thio-phosphatidylcholine) ならびに発色試薬 (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) を入れる。本タンパク質を加えて40℃で適当な時間インキュベートし、その吸光度 (OD:405 nm) の変化を測定する。試料を加えない場合での値と比較することにより、その試料の本分泌型PLA₂に対する阻害活性を評価し得る。

【0033】

スクリーニング方法により得られる化合物

分泌型PLA₂は、脂肪酸（例えば、アラキドン酸）の放出に関与している。過剰な脂肪酸の放出は、敗血症ショック、成人呼吸困難症候群、肺炎、外傷、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ等の疾病の原因となる。本発明のスクリーニング方法により得られる化合物は、分泌型PLA₂の活性を阻害する。従って、該化合物は、過剰な分泌型PLA₂の生産に起因する敗血症ショックなどの治療に有用である。

該化合物には、医薬的に許容される塩もまた包含される。かかる塩には、周知の方法により調整される、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウム等の無毒性アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及びアンモニウム塩等が包含される。

該化合物の薬学的有効量を活性成分として、医薬製剤が調整される。該医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤等の個体投与形態や、液剤、懸濁液剤、乳剤、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に、投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形もしくは調製することができる。

上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等に応じて決定される。例えば、錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル剤等の個体投与形態や、液剤、懸濁液剤、乳剤は経口投与される。

注射剤は単独又はブドウ糖やアミノ酸等の通常の補液と混合して静脈投与される。更に注射剤は、必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。

上記医薬製剤中に含有されるべき本発明化合物の有効成分量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件に応じて適宜選択される。一般的には、該投与量は、1日当たり体重1kg当たり、約1～10mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1～数回

に分けて投与することができる。

本発明の抗体は、本発明の分泌型PLA₂に特異的に結合することにより、本発明の分泌型PLA₂のPLA₂活性を阻害する。従って、本発明の抗体は、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物と同様に、過剰な分泌型PLA₂の生産に起因する敗血症ショックなどの治療に有用である。

【0034】

【実施例】

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

本発明の各工程において用いた一般的な実験手法（DNAのアガロースゲル電気泳動、ライゲーション反応、大腸菌の形質転換、DNAの制限酵素による消化、ノザン解析等）はCurrent Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. Ed., John Wiley & Sons, Inc.)によった。DNAオリゴマーは国際試薬（株）より購入した。データの解析はソフトウェア開発（株）のGENETYX-SV/RCを用いて行った。また、DNA配列の決定には常に複数のクローンの配列を解析し、PCR反応中に起こる可能性あるmisincorporationの影響を排除した。

【0035】

配列表の配列番号1に、ESTデータベース中に検出されたPLA₂をコードすると考えられるcDNA断片の配列を示す。この配列はあくまでも部分配列である。この断片が由来する遺伝子そのものと、その遺伝子がコードする蛋白質の機能を解析するためには、この断片から5'側および3'側につながる未同定のcDNAを単離すると同時にこの断片自身の配列を再確認する必要がある。全長cDNAをクローニングするためには、その遺伝子の発現量の多い組織を材料に用いることが実験操作上有利である。マウス各組織における発現量をノザン解析によって比較するためには、プローブとして用いるPLA₂ cDNA断片を得る必要があるが、このようなPLA₂ cDNA断片はマウス組織由来のcDNA試料を鋳型とするPCRによって単離することが可能である。

【0036】

実施例1 マウス新規PLA₂ cDNA断片の単離

配列番号1のDNA配列をもとに配列番号2から5に示す短鎖DNAオリゴマーを準

備した。これらのDNAオリゴマーは図1に示すような位置関係にある。配列番号2と3のオリゴマーペアからは319塩基対、配列番号4と5のオリゴマーペアからは315塩基対のPLA₂ cDNA断片がPCRによって増幅されると予想できる。さらに、初めに配列番号2と3のオリゴマーで増幅した産物を鋳型とし、続いて配列番号4と5のオリゴマーによるPCRを行えば、高い特異性と感度をもってPLA₂ cDNAを増幅することができると期待できる (Nested-PCR)。

【0037】

まず、129/SvJ系統のマウスの組織（心臓、腎臓、肺）から抽出したmRNAを逆転写してcDNA試料を調製した。このcDNA試料を鋳型に、配列番号2と3のオリゴマーを用いてPCRを行った。酵素は宝酒造（株）のTaKaRa Ex Taqを用い、反応組成は当酵素の使用説明書に従った。増幅装置はPerkin Elmer Cetus社のThermal Cyclerを使用し、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を30サイクルで増幅を行った。反応後、反応溶液の1 μlを鋳型として配列番号4と5のオリゴマーで2回目のPCRを行った。反応条件は1回目と同じである。PCR反応液を2% アガロースゲル電気泳動にかけ、増幅産物を分離した。その結果、調べたすべての臓器由来のcDNAから、予想されるサイズにDNAが増幅されていた。

【0038】

このDNA断片をゲルから切り出し、スペルコ社のGenElute Agarose spin columnによってDNAの精製を行った。このDNAをInvitrogen社のベクターpCRIIとライゲーションし、ライゲーション液で大腸菌DH5α株（TOYOBO社）を形質転換した。得られた組み換え大腸菌を培養し、プラスミドDNAを調製した（Promega社のWizard Plus Minipreps DNA Purification System）。ベクターに挿入されたインサート部分の塩基配列をAmersham Pharmacia Biotech社のALFred DNA Sequencerによって解析した。その結果、配列番号1に示す配列に対応する配列からなるDNAがPCRによって増幅されていたことが明らかとなった。

【0039】

実施例2 マウス各組織における該分泌型PLA₂ mRNA発現パターンの解析

組織における発現の有無ならびに組織間での相対発現量は、各組織から抽出したmRNAを固定したシートを放射標識したDNA断片（プローブ）とハイブリダイゼ

ーションすることによって確認することができる（ノザン解析）。実施例 1 で PCR 増幅後精製した DNA 断片を、Amersham Pharmacia Biotech 社の Megaprime DNA labeling system を用いて放射標識した。この断片をプローブとして Clontech 社の マウス Multiple tissue northern blot をハイブリダイゼーションした。適当な濃度の塩を含む水溶液で洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、調べた臓器の中では心臓において該 PLA₂ mRNA が最も多く発現していることが判明した。

【0040】

実施例 3 マウス分泌型 PLA₂ cDNA 全一次構造の決定

cDNA の既知部分（中央部）の情報から cDNA の 5' 端 3' 端を含む上流下流部分は、以下のような方法によって単離することができる。既知部分の配列よりアンチセンスオリゴマーならびにセンスオリゴマーをいくつか用意する。cDNA 試料として、あらかじめその 5' 端 3' 端にある特定の配列からなるアダプター DNA が付加されているものを鋳型にして、この特定の配列に対応するオリゴマーと PLA₂ 特異的なオリゴマーのペアで PCR を行うことによって、未知部分を含む cDNA を増幅することができる（RACE 法）。

cDNA 試料としては Clontech 社の Marathon-ready cDNA (Mouse spleen) を用いた。RACE 法に用いたオリゴマーを配列番号 6 から 9 に示す。このうち配列番号 6、7 は 5' 上流域を単離するためのアンチセンスオリゴマー、配列番号 8 と 9 は下流域を単離するためのセンスオリゴマーである。

【0041】

RACE 法も中央部分の PCR 増幅と同様に Nested PCR で行なった。5' 側 RACE には、1 回目の PCR では配列番号 6 のオリゴマーと Clontech 社の cDNA 試料に添付のオリゴマー AP-1 を、2 回目の PCR には配列番号 7 のオリゴマーと cDNA 試料 (Clontech) 添付の AP-2 を用いた。3' 側 RACE には、1 回目には配列番号 8 のオリゴマーと AP-1、2 回目には配列番号 9 のオリゴマーと AP-2 を用いた。酵素は TaKaRa Ex Taq を使用し、1 回目は 94℃ 1 分、60℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクル、2 回目は 94℃ 1 分、62℃ 1 分、72℃ 2 分を同じく 30 サイクルで増幅を行った。PCR 後、電気泳動を行い増幅産物を分離した。その結果、5' 側 RACE か

らは約450塩基対、3'側RACEからは約470塩基対のバンドが検出された。これらのDNAを実施例1と同様にクローニングし、その塩基配列をPE Applied Biosystems社のPRISM 310 Genetic Analyzerによって解析し、決定した。

【0042】

ここまでの過程で、PLA₂ cDNAを上流域、中央部、下流域の3つの領域で部分的に単離した。これらのcDNAが連続した1つのcDNAとして存在していることを確認する目的で、配列番号10から13に示すオリゴマーを準備し、Clontech社のMarathon-ready cDNATM (Mouse spleen)を鋳型に配列番号10と12のオリゴマーを用いてPCRを行った。反応後、反応溶液の1 μ lを鋳型にしてオリゴマー11と13で2回目のPCRを行った。いずれも、酵素はTaKaRa Ex Taqを用い、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 2分を30サイクルで増幅を行った。先と同様に増幅されたDNAをクローニングし、その塩基配列の決定を行った。決定されたcDNAの配列を配列番号14に、それによってコードされるアミノ酸配列を配列番号15に示す。

【0043】

タンパク質をコードしている部分の配列からPLA₂タンパク質のアミノ酸残基数は142であることがわかった。本タンパク質は、分泌型PLA₂ファミリー分子間で保存されている全ての構造的特徴（PLA₂活性中心部位、Ca²⁺結合部位の配列、Cys残基数）を保持していた。しかしながら、本タンパク質は、既知の分泌型PLA₂と異なる配列から構成されており、アミノ酸レベルでの相同性は、マウスIB型と35.8%、マウスIIA型と47.7%、マウスIIC型と38.0%、マウスIID型と41.8%、マウスV型と41.0%、マウスX型と35.8%であった。

【0044】

実施例4 ヒト分泌型PLA₂ cDNA全一次構造の決定

一般的に、マウスとヒトでは同じタイプの遺伝子の配列は互いに高い相同性を持つと期待できるが、コンセンサス配列に対応するcDNA配列は、ヒト型PLA₂のcDNA配列と特に相同性が高く、かつマウスPLA₂遺伝子の配列情報をもとにヒトの相同遺伝子をクローニングする場合に利用価値がもっとも高い領域と考えられる。また、実施例3で決定されたマウスのcDNA配列は、IIA型、IID型との相同性が高い

ことが判明したので、対応するヒト分泌型PLA₂遺伝子もヒトIIA型、ヒトIID型との相関性が高いと予測できる。以上の仮定のもとに、実施例3で決定されたマウスのcDNA配列、ヒトIIA型、ヒトIID型のコンセンサス配列部分を基にして、以下の2つのオリゴマーを設計した。

【0045】

配列番号14記載の23位のTyrから28位のGlyまでに対応するcDNA配列をもとに、ヒトIIA型、ヒトIID型のそれぞれに対応するcDNA配列も考慮して、配列番号16からなるオリゴマー（センスオリゴマー）を準備した。また配列番号14記載の46位のHisから52位のArgまでに対応する配列番号17からなるオリゴマー（アンチセンスオリゴマー）も合わせて準備した。これらのオリゴマーを用いてPCRを行うことにより、IIA型を含むIIA型類似のヒトPLA₂遺伝子を、ヒトGenomic DNAから高い感度と特異性を持って単離することができた。PCRは94℃ 1分、50℃ 1分、72℃ 2分を30サイクルで、その他の条件は実施例1と同条件で行った。PCRの鋳型にはBOEHRINGER MANNHEIM社のHuman Genomic DNAを用いた。その結果、それぞれ、約800、350、300塩基対からなる3種類の増幅産物が電気泳動上検出された。

【0046】

これらの断片を実施例1に記したようにクローニングし、その塩基配列の決定を行った。その結果、約800塩基対のDNA断片はヒトIIA型PLA₂、約350塩基対のDNA断片はヒトIID型PLA₂であることが判明した。これらのDNA断片は同じ位置にイントロンの配列を1箇所含んでいたもので、新規PLA₂も、同じ位置にイントロンの配列を含むことが予想されうる。約300塩基対のDNA断片の塩基配列を配列番号18に示す。この塩基配列は、IIA型、IID型PLA₂と同じ位置に212塩基対のイントロンと予想されうる配列（配列番号18の58位から269位）を含んでおり、エクソンと予想されうる配列と実施例3で決定されたマウスのcDNA配列の対応する領域には、85.1%の相関性があった。従って、この断片が新規ヒトPLA₂遺伝子の一部であると予想できた。

【0047】

得られた塩基配列を基にして、センスオリゴマー、アンチセンスオリゴマーをそ

れぞれ3個ずつ設計した。それらのオリゴマーの配列を配列番号19-24に記す。

発現量の多い組織を同定するために、これらのオリゴマーを使って種々の組織由来のヒトcDNAを鋳型として実施例1に記したのと同様にNested-PCRを行った。すなわち、1回目のPCRでは、配列番号19と22のオリゴマーを用い、その増幅産物を鋳型として、2回目のPCRには配列番号20と23のオリゴマーを用いた。PCRは1回目、2回目とも、94℃1分、55℃1分、72℃1分を30サイクルで、その他の条件は実施例1と同条件で行った。1回目のPCRの鋳型には、Clontech社のMarathon-ready cDNA (Human kidney, pancreas, small intestine, spleen, lung, heart, leukocyte, liver) を用いた。その結果、用いた組織のうち最も多く新規ヒトPLA₂を発現しているのは、small intestineであると予想できた。得られたDNA断片は実施例1と同様にしてクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、前項において予想したとおりのエクソン領域からなるcDNA配列であることがわかった。

【0048】

次に、5' 端を含む上流部分をRACE法によって単離した。具体的な実験は、実施例3に記した条件で行い、PCRの鋳型にはClontech社のMarathon-ready PCR cDNA (Human Small Intestine)を用いた。上流域を単離するためのアンチセンスオリゴマーは、配列番号23と24を用いた。その結果、約120塩基対のDNA断片が得られ、塩基配列を決定した。その配列からさらに上流域を単離するためのアンチセンスオリゴマー2個(配列番号25、26)を設計し、同様にしてRACE法を行った。その結果、約150塩基対のDNA断片が得られ、塩基配列を決定した。

【0049】

また、3' 端を含む下流部分は以下のようなNested PCRによって単離した。すなわち、ここまでで得られた塩基配列から、該新規ヒトPLA₂は、対応するマウスとPLA₂との相同性が非常に高いことが判明したので、実施例3で決定されたマウスのcDNA配列(配列番号14)を基にして、595位から615位、601位から621位に対応するアンチセンスオリゴマー2個(配列番号27、28)を準備し

、これらオリゴマーをアンチセンスプライマーに用いたPCRを行った。1回目のPCRでは、配列番号20と28のオリゴマーを用い、その増幅産物を鋳型として、2回目のPCRには配列番号21と27のオリゴマーを用いた。PCRは1回目、2回目とも、94℃1分、55℃1分、72℃2分を30サイクルで、その他の条件は実施例1と同条件で行った。1回目のPCRの鋳型には、Clontech社のMarathon-ready cDNA (Human small intestine) を用いた。その結果、約300塩基対のDNA断片が得られ、実施例1と同様にして塩基配列を決定した。

ここまでの過程でPLA₂ cDNAを、中央部、2個の上流域、下流域に分けて部分的に単離した。これらの塩基配列には連続性があり、それらを連結した配列を配列番号29に記す。

【0050】

タンパク質をコードしている部分の鎖長から、PLA₂蛋白質のアミノ酸残基数は142であることがわかった。本タンパク質（配列番号30）は、分泌型PLA₂ファミリー分子間で保存されている全ての構造的特徴（PLA₂活性中心部位やCa²⁺結合部位の配列、Cys残基数）を保持していた。しかしながら、本タンパク質は、既知の分泌型PLA₂と異なる配列から構成されており、アミノ酸レベルでの相同性は、ヒトIB型と39.0%、ヒトIIA型と51.4%、ヒトIID型と39.2%、ヒトV型と45.7%、ヒトX型と38.2%であった。

【0051】

実施例5 組み換え型PLA₂の発現

得られたcDNA配列を基にしてオリゴマー（配列番号31-34）を準備し、cDNA配列のなかでアミノ酸をコードする部分（コーディング領域）を増幅するNested PCRを行った。1回目のPCRには、配列番号31と33、2回目のPCRには配列番号32と34に示すオリゴマーを用い、鋳型にはClontech社のMarathon-ready PCR cDNA (Human Small Intestine)を用いた。配列番号32に示すオリゴマーは制限酵素NotIで認識される配列とmRNAからタンパク質への翻訳を促進する配列（Kozak sequence）を持ち、配列番号34に示すオリゴマーは制限酵素XbaIで認識される配列を持つ。コーディング領域にはNotIとXbaIが認識する配列はない。従って、PCRで増幅されたcDNA断片をこれらの制限酵素で消化すると、コーディ

ング領域に対応するcDNAが翻訳開始点の上流にKozak配列を含み、さらにNotIとXbaIによって切断された切り口をそれぞれ上流側、下流側の末端にもつcDNAとして調製される。

【0052】

PLA₂発現ベクターは、このcDNAを哺乳動物細胞用の発現ベクターであるpcDNA 3.1(+) (Invitrogen社)のプロモーター下流に順方向になるようNotI、XbaIサイトに挿入して作成した。プロモーターからPLA₂ cDNAにかけての塩基配列を再決定し、構築上人為的な変異が導入されていないことを確認した後、PLA₂発現ベクターをサル腎臓由来の培養細胞であるCOS-7細胞に導入した。導入には、BOEHRINGER MANNHEIM社のFuGENETM6トランスフェクション試薬を用い、方法は使用説明書に従った。導入3日後に、培養上清および細胞ライセート中のPLA₂活性を測定した。PLA₂活性の測定は、³H-オレイン酸で標識した大腸菌膜リン脂質画分を基質として、Elsbachらの方法 (Methods Enzymol. 197, 24-31 (1991)) の方法に従って行った。その結果、PLA₂ cDNAを挿入していないコントロールプラスミドを導入した細胞に比べて、有意に高いPLA₂活性が培養上清中に検出され、分泌型PLA₂であることが確認された(図2)。

【0053】

【発明の効果】

本発明によれば、ヒト分泌型PLA₂；ヒト分泌型PLA₂をコードするDNA；該DNAを含む発現ベクター；該発現ベクターを有する形質転換体；該形質転換体を用いたヒト分泌型PLA₂の製造方法が提供される。

本発明の分泌型PLA₂を用いることで、分泌型PLA₂が関与する疾病の解析手段を提供するとともに、本酵素を特異的に阻害する化合物の探索手段をも提供するものである。その抗体を用いた測定系は、種々の疾患の診断に応用することが可能である。

【0054】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shionogi & Co., LTD.

<120> A gene encoding novel human secretory type

phospholipase A2

<130> 51-06052

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 320

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

cttcaagaga ngagggaac ctgccctgna gtacaatnac tatggctgct attgcggtgt 60

cggtaggctcc cactggccag tgggacgaaa cggattgggtg ttgtcatgcc catgactgct 120

gctatggccg cctggagaan ctgggctgtg accccaagct ggaaaagtac ctcttctcta 180

tcactcgaga caacatcttc tgtgctggtg aaacggcttg ccagcggcat acctgcgaat 240

gtgacaaaa accgtctctt gctttcgcca caacctgaac acttacaacc gcaantatgc 300

ccactacccc aacaagctgt

320

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

cttcaagaga ngagggaac ctg

23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

agcttggttg ggtagtgggc

20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tcaagagang agggaaacct gcc

23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

cttggtgggg tagtgggcat a

21

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggttgtaagt gttcaggttg tgg

23

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

acattcgcag gtatgccgct g

21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

agacaacatc ttctgtgctg gt

22

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ttgccagcgg catacctgcg agt

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

aggtagaaaa gagacctctc tca

23

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

tagacggtga ctcagagctg ca

22

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

ggaaaataga cttctcttat tcag

24

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

agggtattga gatgccagag gc

22

<210> 14

<211> 883

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(591)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (223)..(591)

<400> 14

gaaaagagac ctctctcagt agacggtgac tcagagctgc aggggtgtacc aggcaggtgg 60

actcggtccc catcaccttt gcaacaggga cagagcttgc agtaccaga tgcccctggg 120

agggtggcaga gcaggctccc atgccccctg cctacctccc ccagg atg aaa cct ccc 177

Met Lys Pro Pro

att gcc ctg gct tgc ctt tgc ctc ctg gtg ccc ctg gct ggc ggg aac 225

Ile Ala Leu Ala Cys Leu Cys Leu Leu Val Pro Leu Ala Gly Gly Asn

-15 -10 -5 -1 1

ctg gtc cag ttt gga gtg atg att gag aga atg acg gga aag cct gcc 273

Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Arg Met Thr Gly Lys Pro Ala

5 10 15

ctg cag tac aat gac tat ggc tgc tat tgc ggt gtc ggt ggc tcc cac 321

Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Val Gly Gly Ser His

20 25 30

tgg cca gtg gac gag acg gat tgg tgt tgt cat gcc cat gac tgc tgc 369

Trp Pro Val Asp Glu Thr Asp Trp Cys Cys His Ala His Asp Cys Cys

35

40

45

tat ggc cgc ctg gag aag ctg ggc tgt gac ccc aag ctg gaa aag tac 417

Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Asp Pro Lys Leu Glu Lys Tyr

50

55

60

65

ctc ttc tct atc act cga gac aac atc ttc tgt gct ggt aga acg gct 465

Leu Phe Ser Ile Thr Arg Asp Asn Ile Phe Cys Ala Gly Arg Thr Ala

70

75

80

tgc cag cgg cat acc tgc gag tgt gac aag aga gct gct ctt tgc ttt 513

Cys Gln Arg His Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala Ala Leu Cys Phe

85

90

95

cgc cac aac ctg aac act tac aac cgc aag tat gcc cac tac ccc aac 561

Arg His Asn Leu Asn Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala His Tyr Pro Asn

100

105

110

aag ctg tgt act ggg ccc acc cca ccc tgc tgaggccctg ctcggctcca 611

Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys

115

120

tagccacccc aggctgctgc agtctcaggc ccagagaagc tcggaacca gattcctctc 671

ccagcagact catcccgccc cccccccaga gatcatgagc cctggtctct ggcctccagg 731

accacaccag atccacggga tcagctgaag aagtcacggg actcgtcagc gctcacaaga 791

tccactaagt cgcctctggc atctcaatac cctcttctga ataagagaag tctattttcc 851

cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

883

<210> 15

<211> 142

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Lys Pro Pro Ile Ala Leu Ala Cys Leu Cys Leu Leu Val Pro Leu

-15

-10

-5

Ala Gly Gly Asn Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Arg Met Thr

-1 1

5

10

Gly Lys Pro Ala Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Val

15

20

25

Gly Gly Ser His Trp Pro Val Asp Glu Thr Asp Trp Cys Cys His Ala

30

35

40

45

His Asp Cys Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Asp Pro Lys

50

55

60

Leu Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Ile Thr Arg Asp Asn Ile Phe Cys Ala

65

70

75

Gly Arg Thr Ala Cys Gln Arg His Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala

80

85

90

Ala Leu Cys Phe Arg His Asn Leu Asn Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala

95

100

105

His Tyr Pro Asn Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys

110

115

120

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

ctayggctgy yaytgygg

18

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

gbycrtagca rcagtcatg

19

<210> 18

<211> 300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

ctatggctgt tactgcggca tcggtggctc ccactggccg gtggaccaga ctgactggtg 60

aggaagcagc ctgcaggggg acctccatgg ggatggagga gctgggggat cctgggagga 120

tcctgggaga aggaggggaag cctgggggca cctggaaaat tcaggctgat ctctcctctg 180

ggctactttg ggctcgnggg ccccgagcag cccctgggcc agcccagcct ggctcacagg 240

tccctccagg tcaacatga cccttcagg tgctgccacg cccacgactg ctgctacggg 300

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ctatggctgt tactgcggca tc

22

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

ggcatcggtg gctcccactg g

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

tcccactggc cggtggacca g

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

tagcagcagt cgtgggcgtg g

21

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

tggcagcacc agtcagtctg

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

agtctgtgcc accggccagt g

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

cccaaactga accaggttcc c

21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

ggttcccggg gaccagagcc a

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

gctatggagc cgagcagggc c

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

ggggtggcta tggagccgag c

21

<210> 29

<211> 487

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (59)..(484)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (116)..(484)

<400> 29

ctgctttctt ctgctgcctt ttatgctcct tgtgcacctc ccttccccgc aacctggg 58

atg aaa tct ccc cac gtg ctg gtg ttc ctt tgc ctc ctg gtg gct ctg 106

Met Lys Ser Pro His Val Leu Val Phe Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu

-15

-10

-5

gtc acc ggg aac ctg gtt cag ttt ggg gtg atg atc gag aag atg aca 154

Val Thr Gly Asn Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Lys Met Thr

-1 1

5

10

ggc aag tcc gcc ctg cag tac aac gac tat ggc tgt tac tgc ggc atc 202

Gly Lys Ser Ala Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Ile

15

20

25

ggt ggc tcc cac tgg ccg gtg gac cag act gac tgg tgc tgc cac gcc 250

Gly Gly Ser His Trp Pro Val Asp Gln Thr Asp Trp Cys Cys His Ala

30

35

40

45

cac gac tgc tgc tac ggg cgt ctg gag aag ctg ggc tgt gag ccc aaa 298

His Asp Cys Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Glu Pro Lys

50

55

60

ctg gaa aag tat ctt ttc tct gtc agc gaa cgt ggc att ttc tgc gcc 346

Leu Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Val Ser Glu Arg Gly Ile Phe Cys Ala

65

70

75

ggc agg acc acc tgc cag cgg ctg acc tgc gag tgt gac aag agg gct 394

Gly Arg Thr Thr Cys Gln Arg Leu Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala

80

85

90

gcc ctc tgc ttt cgc cgc aac ctg ggc acc tac aac cgc aaa tat gcc 442

Ala Leu Cys Phe Arg Arg Asn Leu Gly Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala

95

100

105

cat tat ccc aac aag ctg tgc acc ggg ccc acc ccg ccc tgc tga 487

His Tyr Pro Asn Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys

110

115

120

<210> 30

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Lys Ser Pro His Val Leu Val Phe Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu

-15

-10

-5

Val Thr Gly Asn Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Lys Met Thr

-1 1

5

10

Gly Lys Ser Ala Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Ile

15

20

25

Gly Gly Ser His Trp Pro Val Asp Gln Thr Asp Trp Cys Cys His Ala

30

35

40

45

His Asp Cys Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Glu Pro Lys

50

55

60

Leu Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Val Ser Glu Arg Gly Ile Phe Cys Ala

65

70

75

Gly Arg Thr Thr Cys Gln Arg Leu Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala

80

85

90

Ala Leu Cys Phe Arg Arg Asn Leu Gly Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala

95

100

105

His Tyr Pro Asn Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys

110

115

120

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

atgaaatctc cccacgtgct gg

22

<210> 32

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

agtagttgat gcggccgcca ccatgaaatc tccccacgtg ctggtgttc

49

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

tcagcagggc ggggtggg

18

<210> 34

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

taagcttttc tagatcagca gggcggggtg ggcccgtgc acag

44

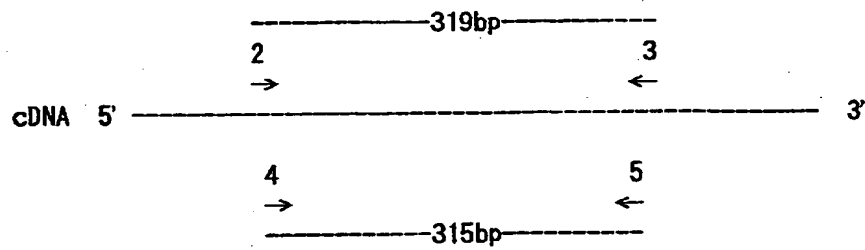
【図面の簡単な説明】

【図 1】 配列番号 2、3、4 および 5 のオリゴマーの相対的な位置関係を示す略図である。

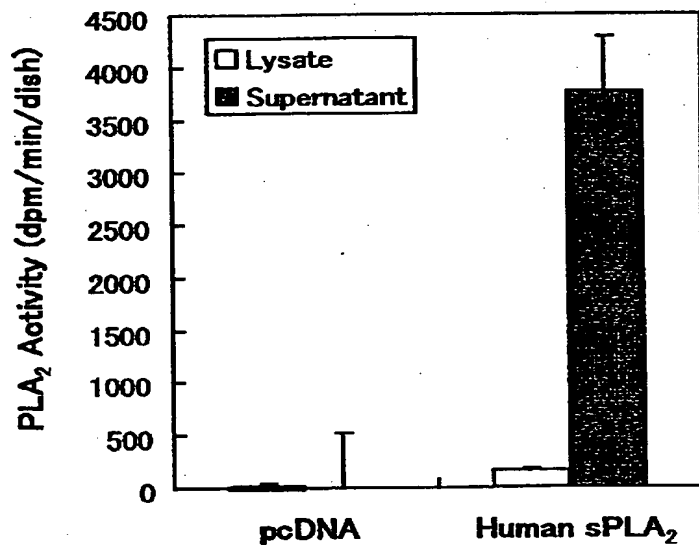
【図 2】 本発明のヒト PLA₂ をコードする遺伝子を有する形質転換体と、PLA₂ を有さない形質転換体の細胞内 (Lysate) と細胞上清中 (Supernatant) の PLA₂ 活性を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 ヒト分泌型ホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) タンパク質をコードする遺伝子が得られた。この遺伝子を有する発現ベクター、および該発現ベクターを導入した形質転換体を得られ、該形質転換体を培養することにより PLA_2 タンパク質が生産される。

【効果】 上記形質転換体を培養することにより、効果的に、ヒト分泌型 PLA_2 タンパク質が生産され得る。このヒト分泌型 PLA_2 タンパク質は、特異的阻害剤のスクリーニングに有用であるとともに、その抗体を用いた本 PLA_2 の測定系は、種々の疾患の診断に応用することが可能である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第266616号
受付番号	59900914842
書類名	特許願
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成11年10月 7日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	000001926
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
【氏名又は名称】	塩野義製薬株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100108970
【住所又は居所】	大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩野義製薬株式会社 特許部
【氏名又は名称】	山内 秀晃

【選任した代理人】

【識別番号】	100113789
【住所又は居所】	大阪府大阪市福島区鷺洲5-12-4 塩野義製薬株式会社 特許部
【氏名又は名称】	杉田 健一

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001926]

1. 変更年月日 1990年 8月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
氏 名 塩野義製薬株式会社